

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2001161214  
PUBLICATION DATE : 19-06-01

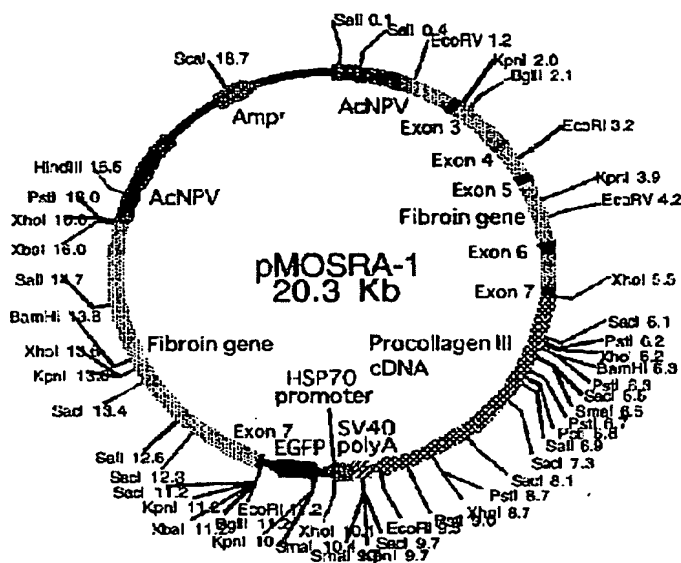
APPLICATION DATE : 13-12-99  
APPLICATION NUMBER : 11353388

APPLICANT : KOKEN CO LTD;

INVENTOR : ADACHI TAKAYASU;

INT.CL. : A01K 67/033

TITLE : TRANSFORMED SILKWORM



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a transformed silkworm producing a recombinant human collagen as a part of protein contained in cocoon and obtain a recombinant human collagen produced by the silkworm.

SOLUTION: The transformed silkworm contains a hybrid gene composed of a human collagen gene and a silkworm fibroin L chain gene and produces a recombinant hybrid protein containing the recombinant human collagen as a part of protein in a cocoon or a sericterium. The invention also provides a recombinant human collagen produced by the silkworm.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-161214

(P2001-161214A)

(43) 公開日 平成13年6月19日 (2001.6.19)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

A 0 1 K 67/033

識別記号

5 0 1

F I

A 0 1 K 67/033

テ-コ-ト (参考)

5 0 1

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平11-353388

(22) 出願日 平成11年12月13日 (1999. 12. 13)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 596063056

財団法人広島県産業技術振興機構

広島県広島市中区千田町3丁目7-47

(71) 出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

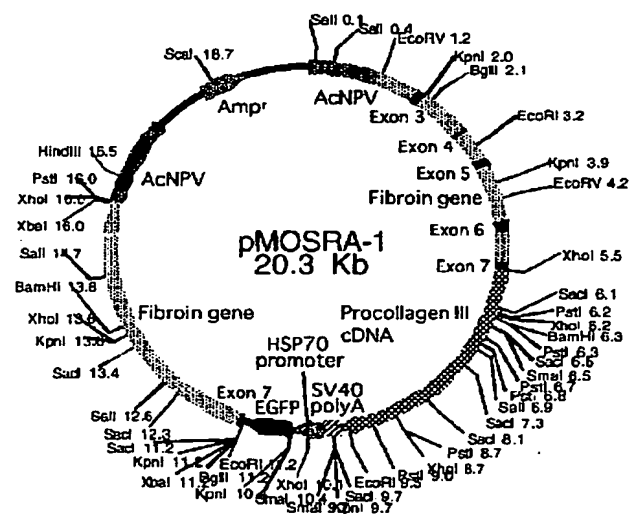
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換カイコ

(57) 【要約】

【課題】 組換えヒト・コラーゲンを繭に含まれるタンパク質の一部として生産する形質転換カイコと、このカイコが生産する組換えヒト・コラーゲンを提供する。

【解決手段】 ヒト・コラーゲン遺伝子とカイコ・フィブロイン鎖遺伝子との融合遺伝子が組み込まれ、組換えヒト・コラーゲンを含む組換え融合タンパク質を繭または絹糸腺内のタンパク質の一部として生産する形質転換カイコと、このカイコが生産する組換えヒト・コラーゲン。



BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト・コラーゲン遺伝子とカイコ・フィブロイン鎖遺伝子との融合遺伝子が組み込まれ、組換えヒト・コラーゲンを含む組換え融合タンパク質を繭または絹糸腺内のタンパク質の一部として生産する形質転換カイコ。

【請求項2】 ヒト・コラーゲン遺伝子とカイコ・フィブロイン鎖遺伝子との融合遺伝子を含み、この融合遺伝子をカイコ・ゲノムDNA内に組み込むことが可能な組換えベクター。

【請求項3】 融合遺伝子を含んだ *Autographa californica* 核多核体ウイルスである請求項2の組換えベクター。

【請求項4】 請求項1記載の形質転換カイコが生産するフィブロイン鎖とヒト・コラーゲンとの組換え融合タンパク質。

【請求項5】 請求項4記載の組換え融合タンパク質からフィブロイン鎖を取り除いた組換えヒト・コラーゲン。

【請求項6】 請求項1記載の形質転換カイコの繭または絹糸腺から、組換えヒト・コラーゲンを含む組換え融合タンパク質を単離し、この組換え融合タンパク質からフィブロイン鎖を取り除くことを特徴とする組換えヒト・コラーゲンの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 この出願の発明は、組換えヒト・コラーゲンを生産する形質転換カイコに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、組換えヒト・コラーゲンを生産する形質転換カイコと、この形質転換カイコを作製するための組換えベクター、形質転換カイコが生産する組換えヒト・コラーゲン、並びに組換えヒト・コラーゲンの製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 コラーゲン (collagen) は細胞外基質を構成する代表的タンパク質であり、細胞の足場となって生体の構造を維持するといった機械的機能の他、細胞の増殖、分化、移動などを制御する様々な生理的機能を有している。そのためコラーゲンは生体の損傷を修復するためのバイオマテリアルとして (J.Surg.Res. 10:485-491, 1970)、またある種の薬剤を徐放するためのキャリアーとして (J.Controlled Release 33:307-315, 1995)、医療分野で広く利用されている。しかし、現在用いられているコラーゲンの大部分はウシやブタ等の動物組織由来のものであり、これらのコラーゲンをヒトに移植した場合、約3%の患者にアレルギー反応が生じることが知られている (J.Immunol.136:877-882, 1986; Bio materials 11:176-180, 1990)。また、動物組織由来コラーゲンにおけるウイルスやプリオン等病原体混入の危険性は近年大きな問題となっている。そのため抗原性が

無く、また病原体混入の危険性が無い組換え型ヒト・コラーゲンを生産するシステムが望まれている。そこで、この出願の発明者らは、ヒト・コラーゲンをコードするcDNAを挿入した組換えウイルスを昆虫細胞に感染させることにより、ヒト生体内のものと同等な三重らせん構造を有する組換えヒト・コラーゲンを製造する方法を発明し、特許出願している (特開平8-23979号公報)。また、哺乳動物細胞や酵母を用いてヒト・コラーゲンを製造する方法も考案されている (特表平7-501939公報)。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 前記のとおり、組換えヒト・コラーゲンを生産する方法として、昆虫細胞、哺乳動物細胞、酵母を用いる方法が考案されているが、昆虫細胞や哺乳動物細胞を用いる方法では医療分野で用いることが可能なほどの高い生産量を上げることは難しい。また、酵母を用いる方法は、組換え産物が菌体内に産生されるため、組換えヒト・コラーゲンの精製は必ずしも容易ではない。

【0004】 この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、高い生産性と精製の容易さを兼ね備えた組換えヒト・コラーゲン生産法と、そのための遺伝子工学材料を提供することを課題としている。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)~(6)の発明を提供する。

(1) ヒト・コラーゲン遺伝子とカイコ・フィブロイン鎖遺伝子との融合遺伝子が組み込まれ、組換えヒト・コラーゲンを含む組換え融合タンパク質を繭または絹糸腺内のタンパク質の一部として生産する形質転換カイコ。

(2) ヒト・コラーゲン遺伝子とカイコ・フィブロイン鎖遺伝子との融合遺伝子を含み、この融合遺伝子をカイコ・ゲノムDNA内に組み込むことが可能な組換えベクター。

(3) 融合遺伝子を含んだ *Autographa californica* 核多核体ウイルスである発明(2)の組換えベクター。

(4) 発明(1)の形質転換カイコが生産するフィブロイン鎖とヒト・コラーゲンとの組換え融合タンパク質。

(5) 発明(4)の組換え融合タンパク質からフィブロイン鎖を取り除いた組換えヒト・コラーゲン。

(6) 発明(1)の形質転換カイコの繭または絹糸腺から、組換えヒト・コラーゲンを含む組換え融合タンパク質を単離し、この組換え融合タンパク質からフィブロイン鎖を取り除くことを特徴とする組換えヒト・コラーゲンの製造方法。

## 【0006】

【発明の実施の形態】 コラーゲンには現在までにI型か

らXIX型までの19種の異なった型のものが存在することが知られている。これらのコラーゲンはいずれも三つのサブユニット( $\alpha$ 鎖)から形成される三量体分子で、その分子内に三重らせん構造をもつことが特徴である。コラーゲンの中には、先ず前駆体であるプロコラーゲンとして合成された後、成熟型のコラーゲン分子に変換されるものがある。例えばI、II、III型コラーゲン等の線維性コラーゲンは、その本体である三重らせん領域のアミノ末端側およびカルボキシル末端側に非三重らせん構造のアミノプロペプチドおよびカルボキシルプロペプチドを有したプロコラーゲンとして合成され、両方のプロペプチドが特異的なプロテアーゼにより切断された後、成熟したコラーゲンとなる。

【0007】この出願の発明が対象とするヒト・コラーゲンは、I型からXIX型コラーゲンを含むすべてのコラーゲンである。また、成熟したコラーゲンに加え、前駆体であるプロコラーゲンやプロペプチドの一部が切断されたものを含む。

【0008】カイコが生産する繭糸の97%はフィブロインおよびセリシンというタンパク質から成り、特にフィブロインは繭タンパク質の70-80%を占める最も主要なタンパク質である。フィブロインは分子量約350kDaのH鎖と25kDaのL鎖から構成される複合体で、5齢期に後部絹糸腺にて大量に合成される。後部絹糸腺では幼虫の生育につれて細胞分裂を伴わないDNA複製が繰り返され、5齢5日目には後部絹糸腺の核内DNA量は2倍体ゲノムサイズの20万倍にも達しそこで合成されるフィブロインの合成量はカイコ頭あたり繭糸の長さとして1.300mにもおよぼほど莫大である。そこでこの出願の発明者らは、カイコの持つフィブロインの優れた合成能力と、繭におけるタンパク質の均一性に着目し、フィブロインの生合成システムを利用することにより、高い生産性と容易な精製法を兼ね備えた組換えヒト・コラーゲン生産法を発明した。

【0009】カイコにおける一過性の外来遺伝子発現システムはカイコ核多核体ウイルス(BmNPV)をベクターとして利用する方法が確立されている(特公平7-97995号公報)。しかし、この方法ではウイルスの感染によりカイコは致死するため、次世代以降に外来遺伝子を伝達することは出来ない。一方、森らはAutographa californica核多核体ウイルス(AcNPV)をカイコに感染させることにより、カイコを致死させることなく遺伝子を導入するシステムを開発し、しかもメスに感染させた場合は生殖細胞を通じて次世代まで外来遺伝子が伝達されることを見いだした(特開平6-277051号公報)。さらに、山尾らはカイコゲノム内の遺伝子配列の一部を組み込んだAcNPVを構築した後、これを感染させ、遺伝子ターゲティングにより外来遺伝子を挿入した形質転換カイコを作製することに成功している(Gene Dev. 13:511-516, 1996)。

【0010】この出願の発明では、山尾らの方法に準じ、AcNPVをベクターとして用いる。ベクター内に組み込むコラーゲンcDNAはフィブロインL鎖遺伝子との融合遺伝子として組み込む。フィブロインL鎖は後部絹糸腺細胞において合成された後、フィブロインH鎖とジスルフィド結合により複合体を形成し繭糸の主要成分として分泌される。従って、フィブロインL鎖遺伝子とコラーゲンcDNAとの融合遺伝子から合成される融合タンパク質もH鎖と複合体を形成した後、効率よく繭糸成分として絹糸腺より分泌されることとなる。なお、コラーゲンcDNAはI型からXIX型コラーゲンのいずれのcDNAであってもよい。これらのcDNAの塩基配列は文献(例えば、Essays Biochem. 27:49-67, 1992; Annu. Rev. Biochem. 64:403-434, 1995)に記載された情報から入手可能であり、例えば、これらのcDNA配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとしてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングする方法や、あるいはcDNA配列の両端に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとし、ヒトの遺伝子を鋳型とするPCR法によって、ヒトI型〜XIX型コラーゲンの各cDNAを得ることができる。

【0011】遺伝子の連結は、例えば組み込むcDNAが線維性コラーゲンをコードするものである場合には、フィブロインL鎖遺伝子の3'末端側に線維性プロコラーゲンをコードするcDNAの5'末端側をアミノ酸フレームが一続きになるように連結して融合遺伝子を作製する。この融合遺伝子からプロコラーゲンのアミノ末端側にフィブロインL鎖が連結された融合タンパク質が合成される。線維性プロコラーゲンのカルボキシル末端側ではなくアミノ末端側にフィブロインL鎖を連結する理由は、プロコラーゲンのカルボキシル末端に存在するカルボキシルプロペプチドが、プロコラーゲン三量体への会合に重要な役割を果たしている領域であり、この領域の末端にフィブロインL鎖を連結するとプロコラーゲンの三量体形成能が失われる可能性があるためである。フィブロインL鎖遺伝子とプロコラーゲンcDNAの連結は、例えばフィブロインL鎖遺伝子第7エクソン内の終始コドン直前、およびプロコラーゲンcDNAのアミノプロペプチド領域をコードする塩基配列の中に同じ制限酵素サイトを導入し、これらを制限酵素で切断した後連結させることにより行うことが出来る。以上の方法により作製した融合遺伝子は、遺伝子ターゲティングによりカイコ・ゲノム内のフィブロインL鎖遺伝子座に挿入される。そのためにはベクターであるAcNPV内に、コラーゲンcDNAを挿入する部分であるフィブロインL鎖第7エクソンから上流および下流のゲノムDNA配列をそれぞれ0.5 kb〜6.0 kb程度挿入する必要がある。例えば、第7エクソンから上流部分のフィブロインL鎖遺伝子はコラーゲンcDNAとの融合遺伝子として挿入し、第7エクソンから下流部分のカイコゲノムDNA配列は

コラーゲン cDNA の下流に組み込むようにする。

【0012】上記のDNA配列を組み込んだ組換えAcNPVベクターは、山尾らの方法 (GenesDev. 13:511-516, 1999) に従い、5齢メス幼虫に接種し、そのカイコ由来するF<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>世代から、PCR法やサザンブロット等の方法を用いて、ゲノムのフィブロインL鎖遺伝子座にコラーゲン cDNA が組み込まれた形質転換カイコを選抜する。選抜を確実にを行うために、ベクター内に例えばGFP (クラゲ由来の蛍光タンパク質) 等のマーカー遺伝子を組み込んでおくこともできる。この場合、マーカー遺伝子の upstream に例えばショウジョウバエHSP70プロモーター等のプロモーター配列を組み込み、その作用によりマーカー遺伝子を発現させるようにする。ベクター内にプロモーターおよびマーカー遺伝子を組み込む場所は、例えばプロコラーゲン cDNA とフィブロインL鎖第7エクソンから下流のカイコゲノムDNA配列の間が適当である。

【0013】選抜された形質転換カイコのフィブロインL鎖遺伝子内にはコラーゲン cDNA が組み込まれており、コラーゲンはフィブロインL鎖との融合タンパク質として産生される。融合遺伝子は内在性のフィブロインL鎖のプロモーターにより転写されるため、融合タンパク質は後部絹糸腺のみにて合成され、その合成は絹糸を作る5齢期に最大となる。後部絹糸腺細胞内で合成されたフィブロインL鎖とコラーゲンの融合タンパク質は、フィブロインH鎖とジスルフィド結合により繋がれた後、効率よく細胞外へ分泌され、繭糸の一部としてカイコの口から吐き出される。繭糸のタンパク質のうち約70~80%はフィブロインであり、融合タンパク質とフィブロインH鎖との結合は還元状態にすることにより切断できるため、繭中からの融合タンパク質の精製は容易に行うことが出来る。また、融合タンパク質に含まれるコラーゲンが線維性コラーゲンであり、三重らせん領域部分 (アテロコラーゲン) のみを精製する場合には、融合タンパク質を含む繭タンパク質をペプシン等のタンパク質分解酵素で処理する。この操作によりタンパク質分解酵素で消化されることのないアテロコラーゲンのみを単離することが出来る。

【0014】

【実施例】以下に、ヒト・III型コラーゲンの製造方法に関する実施例を挙げてこの出願の発明をより具体的に説明するが、この出願の発明はこの例に限定されるものではない。

A. ターゲティングベクターの作製

ヒト・III型プロコラーゲンをコードするcDNAは、この出願の発明者らがクローニングしたcDNA (特開平8-23979号公報: GeneBankデータベース登録番号X14420)、また、カイコ・フィブロインL鎖遺伝子およびその下流のカイコ・ゲノムDNA配列は、既知のカイコ・フィブロインL鎖遺伝子の塩基配列 (Gene 100:151-15

8, 1992: GeneBankデータベース登録番号M76430) を基に以下の方法で単離した。

【0015】なお、以下の記載において、ヒト・III型プロコラーゲン cDNA およびカイコ・フィブロインL鎖遺伝子の塩基番号は、前記GeneBankデータベースに記載されている塩基番号に準じている。

A-1. カイコ・フィブロインL鎖遺伝子およびその下流域ゲノムDNA配列の単離

PCR法を用いてフィブロインL鎖イントロン6内の遺伝子断片の増幅を行った。PCRプライマーは、前記データベースの配列を基に合成したオリゴヌクレオチド (配列番号1および配列番号2) を用い、鋳型にはカイコtokai/asahi strainのゲノムDNAを使用した。次いで、得られたDNA断片をブローグに用いて、λEMBL3により構築されているカイコkinshu/showa strainゲノムライブラリーを定法に従いスクリーニングした。その結果フィブロインL鎖遺伝子の塩基番号9600から下流に約15kbの領域を含んでいるカイコ・ゲノムDNA断片 (pRI/10k) を得た。

A-2. 部位特異的突然変異導入による制限酵素認識配列の作製

フィブロインL鎖遺伝子エクソン7内にIII型プロコラーゲン cDNA を繋ぐため、部位特異的突然変異導入によりフィブロイン遺伝子に新たな制限酵素サイトを設けた。突然変異導入はクロンテック社のMutagenests Kitを使用した。プライマー (配列番号3) はフィブロインL鎖遺伝子エクソン7のストップコドン直前に制限酵素Xho I部位 (配列番号3の位置8-12) を設けるように設計した。鋳型プラスミドには、pRI/10kからEcoRI-SphI断片 (塩基番号12000-14800) をpUC18にサブクローニングしたもの (pRISphI/2.9k) を使用した (Mut pRISphI-XhoI)。同様にして、フィブロインL鎖遺伝子下流域領域フラグメント (塩基番号14200-18900) を挿入するため、突然変異導入によりXbaI部位を新たに設けた。プライマー (配列番号4) はフィブロインL鎖遺伝子エクソン7のストップコドン直前にXbaI部位 (配列番号4の位置12-17) を設けるように設計した。鋳型プラスミドには、先と同様のpRISphI/2.9kを使用した (Mut pRISphI-XhoI)。

【0016】III型プロコラーゲン cDNA のアミノプロペプチドをコードする塩基配列内にも、上記同様の部位特異的突然変異法を用いて制限酵素XhoIのサイトを導入した。プライマー (配列番号5) の塩基配列はIII型プロコラーゲン cDNA の塩基番号292から324に対応し、制限酵素XhoI部位 (配列番号5の位置17-22) が挿入されている。

A-3. トランスファーベクターの構築

クロンテック社のバキュロウイルストランスファーベクターpBacPAK9を制限酵素SmaIおよびEcoRIで消化し、pCa Sepri-hsp (GeneBank登録番号U59056) から切り出したシ

ョウジョウバエHSP70プロモーターとEGFP cDNA (ク  
ロニク) を連結したDNAフラグメント (EcoRV-E  
coRI) をライゲーションした後、大腸菌DH5 $\alpha$ にトラ  
ンスフォームした (pBacPAKhsEGFP)。ライゲーション  
はTakara社Ligation Kit Ver. 1を使用し、トランスフ  
ォーメーション等は定法に従った。

【0017】先に完成したミュータントプラスミドMut  
pRISphI-XhoIからインサート配列のフラグメント (Eco  
RV-XhoI) を切り出し、III型プロコラーゲンcDNA  
のXhoI部位 (突然変異導入により構築) に連結した。続  
いてPCRによってpCEP4 (インビトロジェン) より増  
幅したSV40 polyA付加シグナル配列をコラーゲンcDN  
Aの下流 (BglI部位) に挿入した。そして、完成したフ  
ィブロイン・コラーゲン・polyA付加シグナル配列フラ  
グメント (EcoRV-BglI) をpBacPAKhsEGFPのEcoRV-BglI  
部位に連結した。次にフィブロイン鎖遺伝子のイント  
ロン2の一部〜エクソン7の一部 (塩基番号約10000-1  
3100) をEcoRV部位に挿入した (pBacPAKhsEGFP-Fib  
1)。

【0018】続いてミュータントプラスミドMut pRISph  
I-XbaIからインサート配列のフラグメントEcoRV-SphI  
1.7kbp (塩基番号約13100-14800) を切り出し、pRI/1  
0kのSmaI-SphI (部分消化によって) 部位に挿入した。  
完成したMut RI/10kから切り出したXbaI消化フラグメン  
ト (フィブロイン鎖遺伝子エクソン7の一部およびその下  
流域/塩基番号約14200-18900) をpBacPAKhsEGFP-Fib  
1に挿入した (pMOSRA-1: 図1)。

#### A-4. 組換えウイルスの作製

作製したターゲッティングベクターpMOSRA-1とバキュロ  
ウイルスDNAをヨトウガ培養細胞Sf9にコ・トランス  
フェクションすることにより組換えウイルスの作製を行  
った。pMOSRA-1 0.4 $\mu$ g/ $\mu$ lを7 $\mu$ l、線状バキュロウイ  
ルスDNA (Pharmlingen) 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ lを1 $\mu$ lにリポフ  
ェクチン (Gibco) 4 $\mu$ l、水4 $\mu$ lを加え良く混合した  
後、無血清培地S F900-II (Gibco) に置き換えたSf9  
細胞1 $\times 10^6$  cellsの上に滴下し培養した。24時間後10%  
血清入りGrace培地を1 ml添加してさらに3日間培養し  
た後培養上清を回収した。

#### A-5. 組換えウイルスのスクリーニングおよび純化

1 $\times 10^6$ 個のSf9細胞に上記のウイルス液100 $\mu$ lを加え、  
28°Cで1時間感染させた。上清を除き、1%低沸点アガ  
ロース溶液 (SEAPLAQUE, FMC) を含むGrace培地1 mlを  
加え固化させた。培養3日後、生じたプラークに波長36  
0 nmの励起光を照射し、緑色蛍光を発しているプラ  
ーク、すなわちEGFPを発現している細胞のプラークを10  
個、寒天ごと切り出した。次にこれらのプラークから回  
収した組換えウイルスを再び1 $\times 10^6$ 個のSf9細胞に感  
染させ、細胞内のDNAを抽出し、ドットプロットを行  
った。プローブにはフィブロイン鎖遺伝子を認識する  
プローブとプロコラーゲンcDNAを認識するプローブ

の2種類を用いた。その結果、4つのプラークに由来す  
るウイルスクローンが陽性であった。次にこれら陽性ウ  
イルスを1 $\times 10^6$ 個のSf9細胞に感染させ、3日後に培  
養上清を回収した。培養上清中のウイルスを同様にして  
再びSf9細胞に感染させ、高力価のウイルスストックを  
得た。

#### B. 形質転換カイコの作製

##### B-1. 組換えバキュロウイルスのカイコ5齢幼虫への感 染

カイコ5齢1日目のメス幼虫に50 $\mu$ lのウイルス液 (5  
 $\times 10^6$  pfu) を皮下注射した。接種した幼虫が蛹化し  
てから3〜4日目にメタノールに溶解した20-hydroxyec  
dysone (2 mg/ml) を10 $\mu$ l投与した。羽化後、正常カイ  
コガのオスと交配させ、産卵させた。

##### B-2. F<sub>1</sub>カイコのスクリーニング

1頭のメスカイコが生んだF<sub>1</sub>卵 (100〜300粒) を1グ  
ループとし、各グループから約50粒の卵をサンプリング  
し、残りの卵については飼育を続けた。サンプリングし  
た卵から定法によりDNAを抽出しPCR法により外来  
遺伝子の有無を判定した。PCRは、プライマー (配列  
番号6および7) を用いてSV40 polyA付加シグナルを検  
出するように、またはプライマー (配列番号8および  
9) を用いてHSP70プロモーターを検出するように行っ  
た。

【0019】合計1800グループの卵をスクリーニングし  
た結果、15グループが陽性であり、これらのグループの  
残りの卵を孵化させ、孵化したF<sub>1</sub>幼虫を5齢まで飼育  
した。5齢3日目に各幼虫より約100 $\mu$ lの体液を採取  
し、これらの体液から遠心操作により体液細胞を分離  
し、DNAを抽出した後、PCR法によりスクリーニン  
グを行った。合計3400匹の5齢幼虫をスクリーニングし  
た結果、8匹が陽性であった。これらのカイコは飼育を  
続け、羽化したカイコガを正常カイコガと交配させ産卵  
させた。

##### B-3. F<sub>2</sub>カイコのスクリーニング

F<sub>2</sub>カイコのスクリーニングは緑色蛍光により行った。  
1齢幼虫期に波長360 nmの励起光をあて、EGFPの緑色蛍  
光を発する個体、すなわちマーカー遺伝子として挿入し  
たEGFPを発現している個体を選別した。8グループのF  
<sub>2</sub>卵をスクリーニングした結果、2匹の陽性カイコを得  
ることが出来た。

##### B-4. 組換えヒトコラーゲンの検出

陽性F<sub>2</sub>カイコを吐糸期まで飼育し、繭中のタンパク質  
をSDS-サンプル緩衝液 (0.125Mトリス塩酸緩衝液、  
pH 6.8/4% SDS/10% 2-メルカプトエタノール/20  
%グリセロール) を加えて混合し5分間100°Cで熱処理す  
ることにより抽出した。この試料をSDSポリアクリル  
アミドゲル電気泳動 (Nature 227:680-685, 1970) に供  
し、Matudairaらの方法 (J. Biol. Chem. 261:10035-10  
038, 1987) に準じて、泳動されたタンパク質をニトロ

セルロース膜BA85 (S&S社) に転写した。次に、タンパク質が転写されたニトロセルロース膜をブロッキング液 (3% BSA / 50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 / 150 mM NaCl) で 4℃ において 16 時間処理した後、ブロッキング液で 200 倍に希釈した抗ヒト・III 型コラーゲン抗体と室温で 1 時間反応させた。これらの抗体が反応するタンパク質をベクタステイン ABC キット (ベクターラボラトリー社) で検出した。その結果、菌中からヒト・III 型コラーゲンを検出することが出来た。

#### B-5. 組換えコラーゲンの精製

上記の組換え F<sub>2</sub> カイコを正常カイコと交配させ、F<sub>3</sub> カイコを得た。このカイコを 5 齢期まで飼育し、全てのカイコから体液を採取し、PCR 法により組み換え遺伝子の有無を判定した。その結果、約 50% のカイコからヒト・コラーゲン遺伝子が検出された。これら組換え F<sub>3</sub> カイコは正常に吐糸し繭を作ったため、繭からの組換えコラーゲンの抽出・精製を試みた。10 個の繭を 5% 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 中で破碎した後、4℃ で 24 時間タンパク抽出を行った。次にこの抽出液を 0.5 M 酢酸に透析した後、ペプシ

ンを加え、非コラーゲンタンパク質および組換え融合タンパク質のフィブロイン鎖部分を消化した。さらに定法に従いコラーゲンを精製した。その結果、以上の簡単な操作により、純度の高いヒト III 型コラーゲン 約 100 mg (10 mg / 繭) を得ることができた。

#### 【0020】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、組換えヒト・コラーゲンを繭に含まれるタンパク質の一部として生産する形質転換カイコと、このカイコが生産する組換えヒト・コラーゲンが提供される。組換えヒト・コラーゲンは、形質転換カイコの吐き出す繭中から回収するため、抽出しやすく、純度の高いコラーゲンを容易に得ることができる。また、形質転換カイコの生産する組換えヒト・コラーゲンは、ウイルスやプリオン等の病原体混入の危険が無く、またヒトに対して抗原性の無い安全ヒト・コラーゲンであるため、医療、食品、化粧品等の様々な産業分野で利用することが可能である。

#### 【0021】

##### 【配列表】

<110>: 科学技術振興事業団

<110>: (財) 広島県産業技術振興機構

<110>: テルモ株式会社

<110>: 株式会社高研

<120>: 形質転換カイコ

<130>: NP99491

<160>: 9

<210>: 1

<211>: 22

<212>: DNA

<213>: Artificial sequence

<220>:

<213>: Synthesized oligonucleotide

<400>: 1

tctgaactgc ctacacgttt gc

22

<210>: 2

<211>: 20

<212>: DNA

<213>: Artificial sequence

<220>:

<213>: Synthesized oligonucleotide

<400>: 2

agaactgaac ctgctgct

20

<210>: 3

<211>: 15

<212>: DNA

<213>: Artificial sequence

<220>:

<213>: Synthesized oligonucleotide

<400>: 3

tttagactcg agcct	15
<:210>: 4	
<:211>: 25	
<:212>: DNA	
<:213>: Artificial sequence	
<:220>:	
<:213>: Synthesized oligonucleotide	
<:400>: 4	
tacagttcctt atctagacgt gaacc	25
<:210>: 5	
<:211>: 33	
<:212>: DNA	
<:213>: Artificial sequence	
<:220>:	
<:213>: Synthesized oligonucleotide	
<:400>: 5	
gacataatat gtgacgctcg agaattagac tgc	33
<:210>: 6	
<:211>: 22	
<:212>: DNA	
<:213>: Artificial sequence	
<:220>:	
<:213>: Synthesized oligonucleotide	
<:400>: 6	
ggatccagac atgataagat ac	22
<:210>: 7	
<:211>: 21	
<:212>: DNA	
<:213>: Artificial sequence	
<:220>:	
<:213>: Synthesized oligonucleotide	
<:400>: 7	
gatcataatc agccatacca c	21
<:210>: 8	
<:211>: 22	
<:212>: DNA	
<:213>: Artificial sequence	
<:220>:	
<:213>: Synthesized oligonucleotide	
<:400>: 8	
gatecccccta gaatcccaaa ac	22
<:210>: 9	
<:211>: 22	
<:212>: DNA	
<:213>: Artificial sequence	
<:220>:	
<:213>: Synthesized oligonucleotide	
<:400>: 9	
cttagcgacg tgttcacttt gc	22

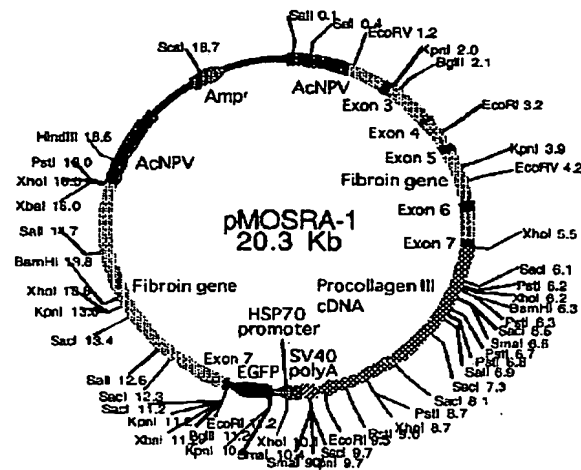
【図面の簡単な説明】

【図1】トランスラファクターpMOSRA-1の制限酵素



地図である。

【図1】



EST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(71)出願人 591071104  
株式会社高研  
東京都豊島区目白3丁目14番3号  
(72)発明者 吉里 勝利  
広島県東広島市八本松南7丁目22-13

(72)発明者 富田 正浩  
広島県東広島市西条中央5-1-19  
(72)発明者 佐藤 勉  
広島県東広島市西条中央7-21-36  
(72)発明者 安達 敬泰  
広島県東広島市西条町下見4215-1